

# バクテリオロドプシンの機能解析と工学応用

Bacteriorhodopin: Molecular-level Function and Its Applicability

佐賀佳央\*・渡辺 正\*

Yoshitaka SAGA and Tadashi WATANABE

バクテリオロドプシン (bR) は最も単純な光駆動型プロトンポンプであり、その機能の解明はイオンポンプを始めとするタンパク質の動的挙動の理解に大きく役立つ。筆者らは、光変換デバイス化も念頭において bR の光電気化学特性を調べている。本稿では、bR の基本的性質とこれまで行われた光電応答に関する研究を概観したのち、当研究室で得られた成果の一部を紹介する。

## 1. はじめに

生命科学の進歩により、タンパク質や核酸を始めとする生体物質の巧妙な構造・機能が明らかになってきた。研究の進展の中で、生体分子の機能解明にとどまらず、生体機能分子を利用もしくは模倣する試みがさかんになりつつある。

酵素の基質認識機能を利用したバイオセンサーは、グルコースオキシダーゼを用いた酵素電極の報告 (1967年)<sup>1)</sup>以降、数多くの研究が行われ<sup>2)</sup>、実用化に至ったものもある。また、機能性タンパク質1個をメモリー機能やスイッチング機能を持つ素子として、微小デバイスを構築するバイオエレクトロニックデバイス<sup>3)</sup>は、シリコンの集積度がいずれ限界に達するとの予測から提唱された分子素子<sup>4)</sup>の考えに派生する。実用化にはまだ遠い段階だが、興味深い概念である。

バイオセンサーやバイオチップの材料として期待されているタンパク質に、酵素、チトクロム c, ATPase, 光合成反応中心などがあり、本稿で解説するバクテリオロドプシン (bR) もそのひとつである。bR は高度好塩菌 *Halobacterium halobium* の細胞膜に存在する膜タンパク質で、光吸収により細胞の内側から外側へプロトンを輸送する機能を持つ。分子量が26700と小さい、最も単純なイオンポンプだといえる。また、プロトン輸送過程で bR の吸収極大が変化し、レチナルはいわばプローブとして働いているため、プロトン輸送過程における中間体をとらえることができる。これらの性質により、イオンポンプのモデル的存在として、生化学、生物物理学を始めとする多くの分野で研究が行われ、同時に光デバイスへの応用も試みられて

きた。以下、これまでの研究で明らかになった bR の基本的性質とデバイス構築の試みを概観したのち、当研究室で行っている研究の一部を紹介したい。

## 2. バクテリオロドプシン

### 2.1 高度好塩菌

高度好塩菌は、名前のとおり食塩濃度の高い水圏 (食塩濃度23 g/100 ml 以上) に生育する細菌である。世界中に広く分布し、日射の強い塩田跡地や塩湖で繁殖している。高度好塩菌が多量に生育している塩田跡などは、この細菌の細胞膜に含まれるカロチノイド色素が赤紫色に染める。古くから知られている天日塩の赤紫色の着色は高度好塩菌の混在によるもので、中国ではこの着色を塩の濃縮度の目安にしていたという。

高度好塩菌は、真核生物でも真性細菌でもなく、古細菌 (Archaeobacteria) に分類される (古細菌に分類されない種も存在する)。古細菌は細胞膜の構造、リボソーム RNA の特徴などが、真核生物、真性細菌と大きく異なる。生物の系統進化の観点では、かつてただ1種類だった生物が真性細菌と古細菌に分かれた後、古細菌から真核生物が派生したと推測されている<sup>5)-7)</sup> (Fig. 1)。古細菌は好熱性細菌 (Crenaechaeta) とメタン菌の仲間 (Euryarchaeota) に分かれ、メタン菌から高度好塩菌が派生した。

1960年代後半、Stoeckenius と Rowen は高度好塩菌の1種 *Halobacterium halobium* の細胞膜に、規則正しくならんだ紫色の部分を見つけた<sup>8)</sup>。紫膜と呼ばれるこの部分は、直径およそ0.5 μm のパッチ状で厚さは4~5 nm である。組成は25%が脂質、残り75%は単一のタンパク質バクテリオロドプシン (bR) である<sup>9),10)</sup>。紫膜は二次元の規則正しい構造をとり<sup>11)</sup>、その中で bR が3量体として存

\*東京大学生産技術研究所 第4部

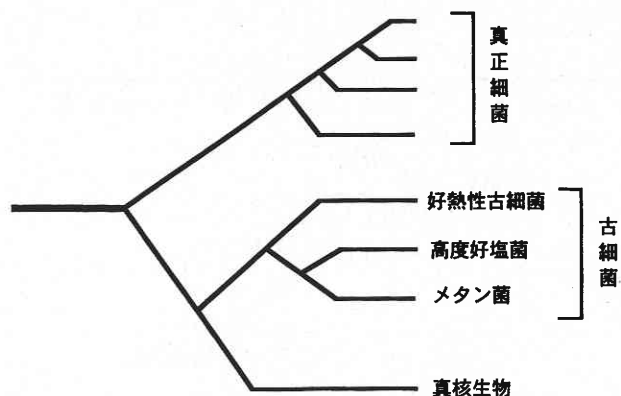


Fig. 1 Position of Archaeobacteria in the evolution tree

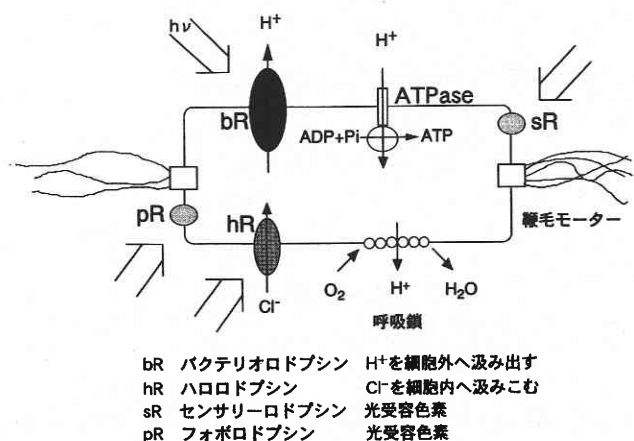


Fig. 2 Various light conversion schemes in *H. halobium*

在している。1973年に Oesterhelt と Stoeckenius は、bR が光駆動型プロトンポンプであることを明らかにした<sup>12)</sup>。bR の生むプロトンの電気化学ポテンシャル差が ATP 合成酵素系を駆動する。やがて Racker と Stoeckenius は、bR と F<sub>0</sub>・F<sub>1</sub>-ATPase を再構成ベシクルに取り込ませ、光照射により ADP とリン酸から ATP が合成されるのを証明した<sup>13)</sup>。*H. halobium* はふだん酸素呼吸で生きているが、酸素を断った嫌気的条件下では、bR が光エネルギーを使って作り出す細胞膜内外のプロトンの電気化学ポテンシャル差で ATP 合成などを行う (Fig. 2)。これは一種の光合成といえよう。

*H. halobium* は bR のほかにもいくつかのレチナル結合タンパク質を持つ。そのうちハロロドプシンはクロライドポンプで、塩化物イオンを細胞の外側から内側に汲み込む<sup>14)</sup>。また、センサリーロドプシン<sup>15), 16)</sup>とフォボロドプシン<sup>17)</sup>は光感覚器官であり、細菌の走行性に関与している。bR を始めとするこうしたレチナル結合タンパク質については総説<sup>18)</sup>で紹介されている。

## 2.2 バクテリオロドプシンの構造と光反応サイクル

膜タンパク質は一般に結晶化しにくい。X 線回折による立体構造の決定がむずかしいため、今まで立体構造が明らかになった膜タンパク質は少ない。

バクテリオロドプシン (bR) は紫膜の中で二次元結晶として存在している。これに注目した Henderson と Unglin は1975年、斜方向低温電子顕微鏡像の高分解能三次元再構成により構造に関する情報を得た<sup>19)</sup>。このとき得られた分解能 7 Å のモデルは膜タンパク質の構造に関する最初の有用な知見となった。その後、1990年に 3.5 Å 分解能のモデルが発表され<sup>20)</sup>、1996年にはさらに詳細な構造が報告された<sup>21)</sup>。

bR の構造模式図を Fig. 3 に示す。7本の膜貫通αヘリックスがレチナルを取囲む構造を持ち、この基本構造は動物の網膜に存在する視物質ロドプシンに似ている。ヘリックス B, C, D は膜面にほぼ垂直であり、ヘリックス A, E, F, G は膜面への法線から 10°~20°ほど傾いている。

bR の発色団である全トランスレチナルは216番目のアミノ酸リジンとシッフ塩基結合している。プロトン輸送はレチナルの13シス型への光異性化により始まる。光異性化でタンパク質の構造が変わり、プロトン輸送経路に存在するアミノ酸の pK がシフトしてプロトンリレーが働く。プロトン輸送は約 10 ms でもとの bR に戻るサイクル反応であり、動物の網膜に存在する視物質ロドプシンが最後にレチナル分子を遊離するのとは対照的である。

光反応サイクルは、時間分解分光法や極低温における吸収測定などで研究が進められ、吸収極大が異なるさまざま

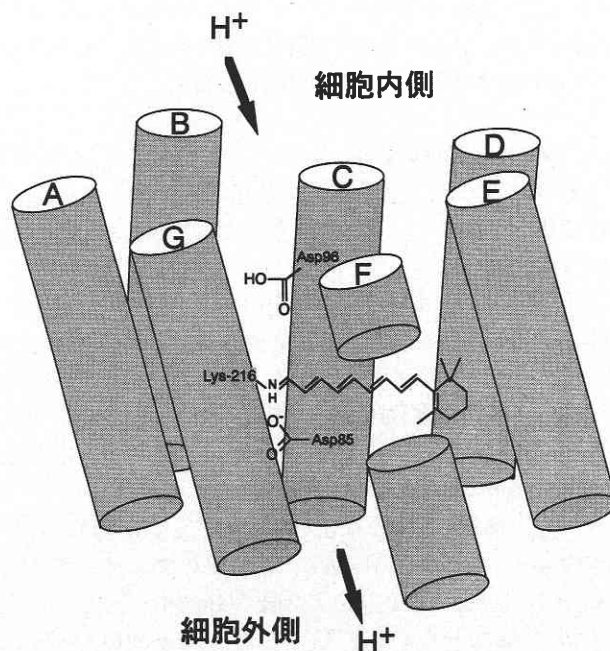


Fig. 3 Molecular structure of bacteriorhodopsin

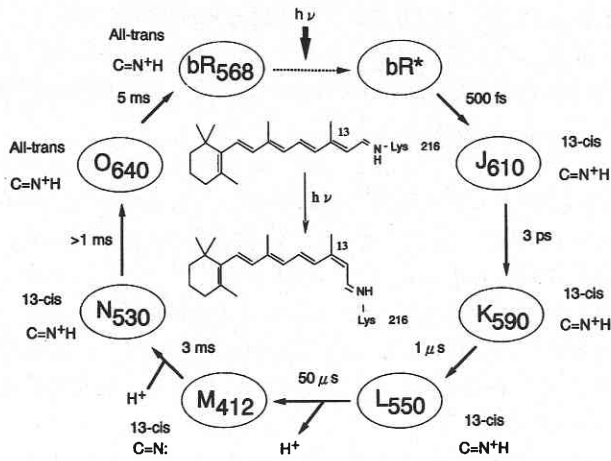


Fig. 4 Photocycle of bacteriorhodopsin

な中間体が同定された。光反応サイクルを Fig. 4 に示す。レチナルの光異性化によってできる最初の間体は J と呼ばれ、基底状態の bR より長波長に吸収極大を持つ<sup>22)-25)</sup>。この中間体は時間分解分光法では確認されたが、低温下の分光測定では確認されておらず、不安定だと考えられる。以後、準安定な K 中間体<sup>26)-28)</sup>が生じ、さらにはタンパク質の構造変化が起こる過程で L 中間体<sup>15)</sup>、M 中間体へと変化する<sup>29)-32)</sup>。光反応サイクルにおいて重要な点は、L→M の変化過程でシッフ塩基からプロトンが解離することである。このとき吸収極大は短波長 (412 nm) にシフトする。M 中間体生成前に細胞外へのプロトンの放出が、生成後に細胞内側からのプロトンの取り込みが進む。以上の後、レチナルが13シス型でシッフ塩基が再プロトン化した N 中間体<sup>31), 32)</sup>、レチナルが全トランス型に戻っているがタンパク質の構造はおそらくもとに戻っていない O 中間体を経て、最初の bR に戻る。

2.3 プロトン輸送の経路

bR の内部では、輸送経路に存在するアミノ酸残基の pK 変化を介してプロトンが一方方向に輸送されると考えられている。

遺伝子工学の進歩により、特定のアミノ酸を別のアミノ酸に変換した変異タンパク質をかなり容易に作れるようになった。bR でも、プロトン輸送に関わるアミノ酸の同定を目的として、80年代後半から変異体のプロトンポンプの活性測定や分光法 (とりわけ赤外分光法) による測定が行われている<sup>33)-43)</sup>。

プロトン輸送で重要な役割を果たすアミノ酸には、85番目のアスパラギン酸 (Asp85)、96番目のアスパラギン酸 (Asp96)、204番目のグルタミン酸 (Glu204)、そしてレチナルを結合した216番目のリジン (Lys216) がある (Fig. 5)。Asp85をアスパラギンに置換した変異体では、

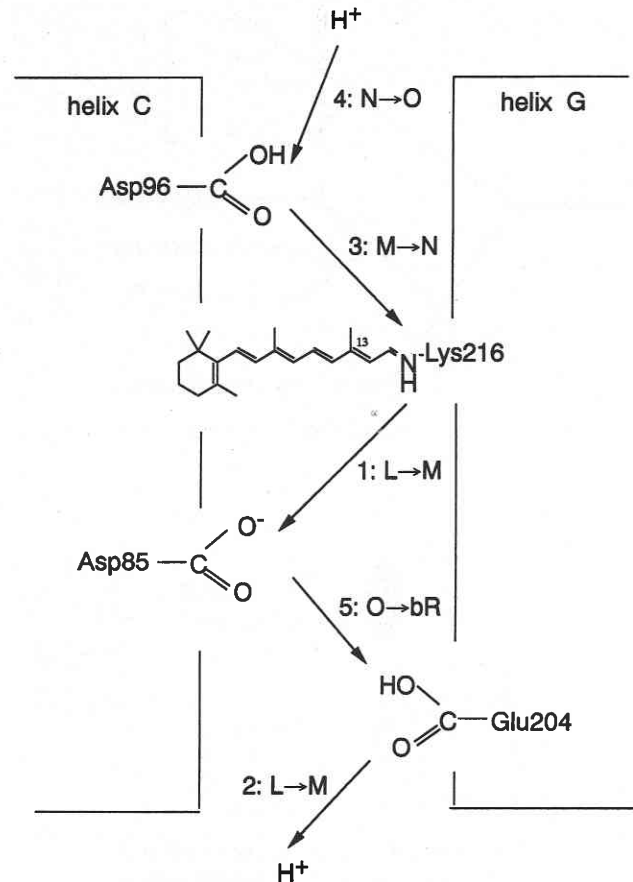


Fig. 5 Proton pathway and role of specific amino acids in the pump function

M 中間体の生成が遅くなってプロトンポンプ活性が失われる事実より、Asp85はシッフ塩基から解離するプロトンを受け取ると考えられる<sup>35)-37)</sup>。また、Asp96をアスパラギンに置換すると M 中間体の減衰が非常に遅くなり、プロトンポンプ活性もほぼ消失した<sup>35), 38)-40)</sup>。このことから、Asp96はシッフ塩基へプロトンを供給すると推測できる。

さらに、Asp85の受け取ったプロトンは外へ直接に放出されるのではなく、別のアミノ酸が介在すると予測されていたが、最近 Glu204がそれであると Brown らが報告した<sup>41)</sup>。変異体を用いた時間分解の可視吸収測定、赤外分光測定の結果から、膜面付近に存在する Glu204がプロトンを放出するらしいと判明したのである。

プロトン輸送経路に存在する水分子がレチナルシッフ塩基や近くのアミノ酸と水素結合し、プロトンポンプの機能の一端を担う可能性も示唆されている<sup>42), 43)</sup>、その解明は今後の研究課題となる。

3. バクテリオロドプシンを用いた光デバイス構築の試み

3.1 緒言

タンパク質を始めとする生体機能分子がふだん働く環境

Table 1 Proposed methods for bR immobilization

固定化法	年	報告者
○リン脂質平面膜への再構成	1981	Bamberg et al. <sup>46)</sup>
	1988	Braun et al. <sup>47)</sup>
○LB法	1977	Hwang et al. <sup>48)</sup>
	1985	Schildkraut and Lewis <sup>49)</sup>
	1986	Furuno et al. <sup>50)</sup>
	1989	Miyasaka et al. <sup>51)</sup>
	1991	Miyasaka and Koyama <sup>52)</sup>
○電着法	1978	Nagy <sup>53)</sup>
	1983	Varo <sup>54)</sup>
	1984	Groma et al. <sup>55)</sup>
	1986	Kononenko et al. <sup>56)</sup>
○ポリリジンを介した吸着	1978	Fisher <sup>57)</sup>
○ポリアクリルアミドゲルへの取り込み	1988	Liu and Ebrey <sup>58)</sup>

は、デバイスになったときに働く環境と大きく異なる。そのため、タンパク質をデバイスのような工学材料として用いるためには、特別な機能を持っているほかに、いくつかの条件がある。以下のような理由で、bR は工学材料に適していると考えられる。

上述のように、プロトン輸送過程がサイクル反応であることは、光刺激の繰り返しに耐えるため工学応用には望ましい。また、bR はきわめて安定性が高く、100 °C 以上の温度でも変性しないという報告もある<sup>44)</sup>。高い安定性は工学材料には欠かせない。さらに、浸透圧で破壊した細胞膜画分を密度勾配遠心にかけるといった簡単な操作で、純粋な bR を大量に得られる。この精製の容易さも利点といえる。

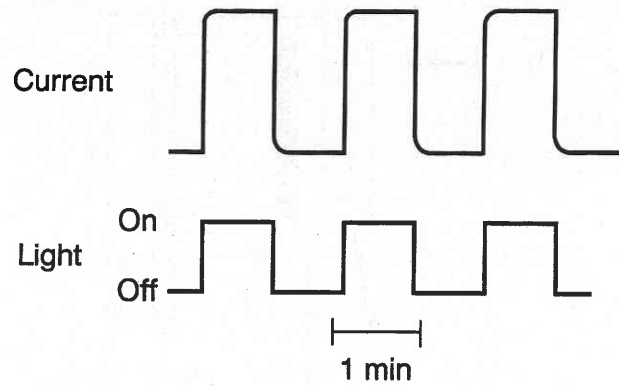
bR の固定化、光電応答測定はさまざまな方法で研究されている<sup>45)</sup>。これまで行われた固定化法を簡単に Table 1 に示し、その一部を次に紹介する。

### 3.2 脂質二分子膜に取り込んだ bR の光電応答

イオンポンプは、生体膜という場に埋め込まれて初めて機能を発揮する。このようなイオンポンプの機能を調べるには、酵素反応のような水溶液系では不十分である。そこで、研究対象のイオンポンプをリン脂質に組み込む方法がよく用いられる。一般には、リポソームやリン脂質の平面膜中に再構成する。bR についてもそのような研究が行われてきた<sup>46), 47)</sup>。

bR を埋め込んだ脂質二分子膜の両側に電極を入れて定常光を照射したところ、膜を透過するプロトンによる定常電流が観測された<sup>47)</sup>。かけた電圧と電流の関係は Fig. 6 のようになる。プロトン輸送による電流が膜両側の電圧に大きく依存するのは、律速段階であるシッフ塩基の再プロトン化が静電力の影響を受けることを示唆する。

(A)



(B)

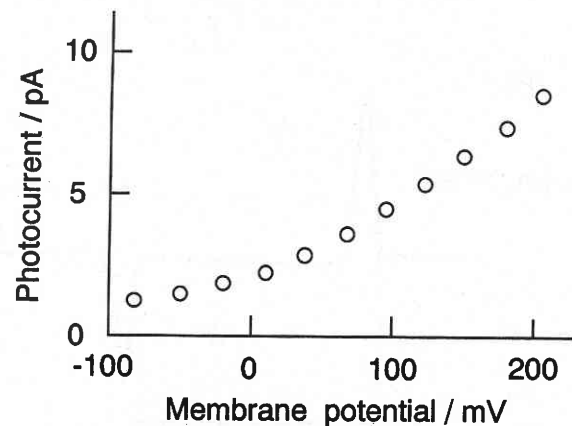


Fig. 6 Photocurrents from a planar lipid bilayer containing oriented bacteriorhodopsin. (A) photocurrents in response to saturating light pulses. (B) Voltage dependence of the photocurrent recorded from the same membrane.

### 3.3 ISFET を用いた bR の光電応答

イオン感応性電界効果型トランジスタ (ISFET) は、イオン感応層の膜表面と電解液との界面電位差が溶液のイオン濃度で変わることを利用して、この界面電位の変化を検出する。イオン選択性にすぐれ、小型化も容易なところから、注目されている。

ISFET のゲート上に形成された多孔性のアセチルセルロース薄膜に紫膜を取り込み、bR が出すプロトンの検出を行った<sup>59)</sup>。光を照射したところ、出力電位の変化が観測された。出力電位はプロトン濃度を反映し、光照射を続けると電位はプロトン濃度が上昇する向きに変化した。bR と ISFET の特性を生かした光デバイスだといえる。

### 3.4 電極に固定された bR の光電応答

bR の電極への固定化は、さまざまな方法で行われ、超薄膜作製法として期待される LB (Langmuir-Blodgett) 法での固定化も試みられている<sup>48)-52)</sup>。宮坂らは水・ヘキ

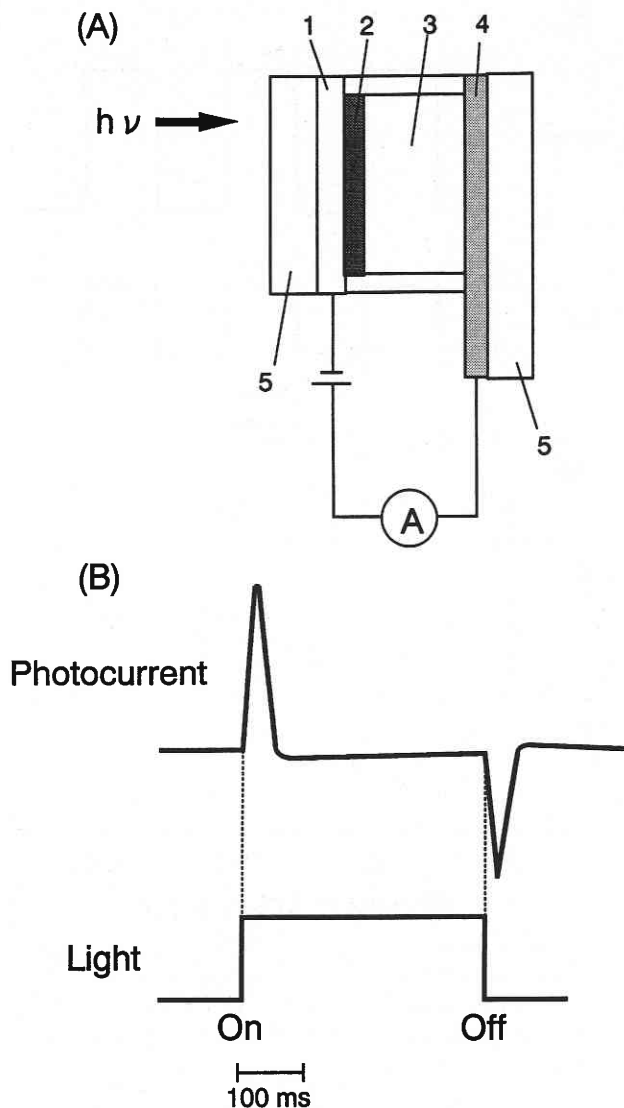


Fig. 7 (A) Structure of bR-immobilized thin sandwich-type photocell: 1,  $\text{SnO}_2$  transparent conductive layer; 2, bacteriorhodopsin LB film; 3, aqueous electrolyte gel layer; 4, Au layer; 5, glass substrate. (B) Photocurrent response of sandwich-type photocell

サン・DMF 混合溶媒に懸濁させた紫膜を気液界面に展開することにより, bR の安定な単分子膜を作製した<sup>51), 52)</sup>. この LB 膜は光照射に際して, 微分型の光電流応答を示し<sup>51), 52), 60)</sup> (Fig. 7), イメージセンサーに応用できる<sup>61), 62)</sup>. 256ピクセルの ITO (酸化インジウム・スズ) 基板を LB 法によって bR で被覆し, ピクセルにそれぞれ含水高分子電解質ゲルをはさんで対極を取り付け, 独立した並列回路を作った. ピクセルで生じる光電流を電圧にしてから増幅し, 表示用発光ダイオード (LED) に出力する. スライドプロジェクターからセンサーに像を投影したところ, 静止画像には応答しないが, 動画像には応答する

イメージセンサーが得られた.

宮坂グループはまた, bR の C 末端 (細胞内側) と N 末端 (細胞外側) を認識するモノクローナル抗体を用いて, bR の LB 膜の配向がランダムであることを示した<sup>63)</sup>. これに基づき, Bispecific (BS) 抗体を利用した配向制御に成功した<sup>64)</sup>. 細胞の内側を電極に向けた配向と外側を電極に向けた配向を比べると, 内側を電極に向けた場合のほうが応答は大きかった.

#### 4. 筆者らの光電気化学的研究

##### 4.1 緒言

電極上の bR に由来する光電応答の起源は今のところあまり明らかではない. これを含めて, bR の光電応答の特性解明は, プロトンポンプのメカニズム解析に役立つだけでなく, bR を用いる光デバイスの設計指針をもたらすと期待できる.

上で紹介したサンドイッチ型セルは, 湿度で応答が大きく変わるといふ問題があるし, 測定条件のこまかい制御もむずかしい. そこで当研究室では, 電気化学で常用される 3 電極系の定電位法で光電流を測定し, 発生機構の解析を行っている.

##### 4.2 実験

*H. halobium* の培養と bR の分離は常法<sup>65)</sup>に従った. 精製した bR を, 吸収大での吸光度が 1 (光路長 1 mm) になるよう純水に懸濁させ, その 50  $\mu\text{l}$  を酸化スズ電極 (厚さ 200 nm) 上  $1 \times 1 \text{ cm}$  に広げ乾燥させて固定化した. 電解質溶液には 100 mM の硫酸ナトリウムを含む 50 mM トリス緩衝液 (pH=7.0) を用いた. 測定系を Fig. 8 に示す. 光源として 500 W キセノンランプ (ウシオ電機, UXL-500D) を用い, 水フィルターで赤外線を除いた. 紫外線カットフィルター (東芝硝子, L-39) で紫外線も除いた光をバンドスフィルター (東芝硝子, G-55S) に通して擬単色光を得た. なお, 作用スペクトル測定では, バンドパスフィルターの代わりに干渉フィルター (光伸光学

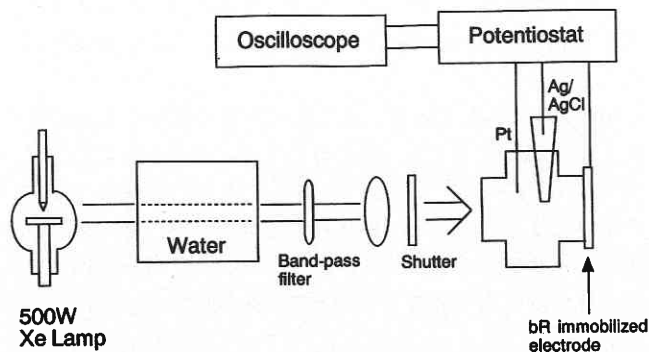


Fig. 8 Photoreponse measurement setup for bR-electrode

工業)を用いた。bR 固定化電極を作用電極とし、参照電極に銀/塩化銀電極を、対極に白金を用い、ポテンシostat (東方技研, POTENTIostat / GALVANOSTAT 2000) で電位を制御しつつ、光照射によって発生する光電流をオシロスコープ (Sony Tektronix, TDS340P) で記録した。光強度の測定にはパワーメーター (アンリツ, MA9411A) を用いた。

### 4.3 結果と考察

bR を固定した酸化スズ電極に光照射したときの典型的

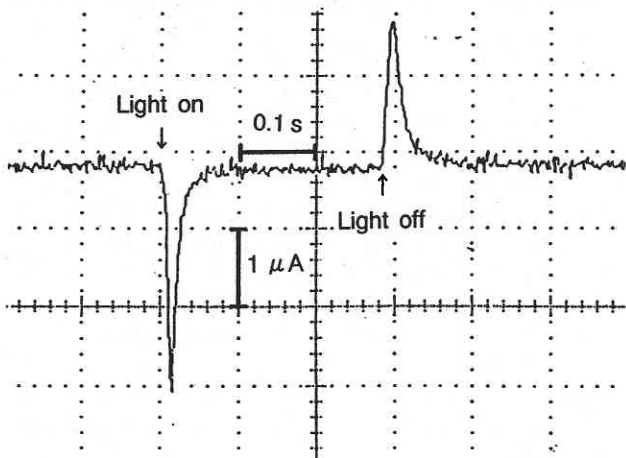


Fig. 9 Photocurrent response of the bR-SnO<sub>2</sub>/electrolyte interface. Electrode potential, -0.2 V vs. Ag/AgCl. Green light intensity, 230 mW/cm<sup>2</sup>

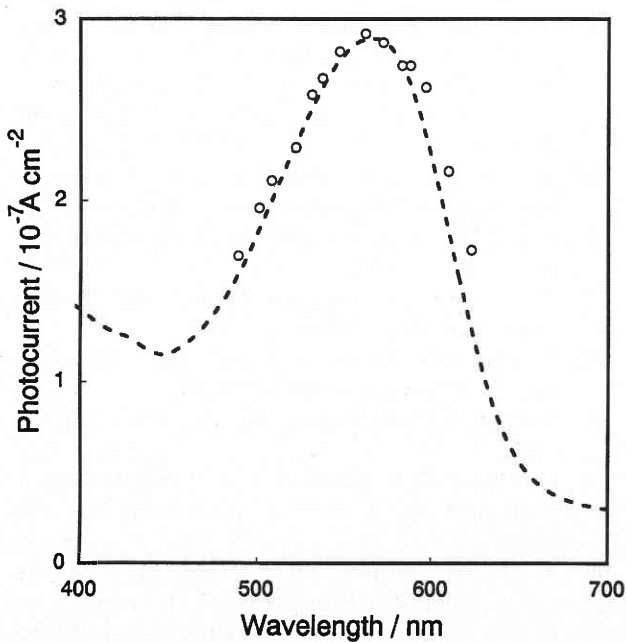


Fig. 10 Photocurrent action spectrum. Electrode potential, -0.2 V vs. Ag/AgCl. Broken curve is the absorption spectrum of bR. Incident monochromatic photon flux,  $3.26 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$

な応答パターンを Fig. 9 に示す。光を照射した瞬間にカソード方向 (電極から溶液に負電荷が動く向き) の一過性電流が観測され、光照射を止めた際には逆向きの電流が生じた。これは、太陽電池などの光電変換デバイスでは定常光電流が流れるのと好対照をなす。572 nm の単色光を照射した場合、光電流のピーク時に動いた電荷と吸収光子数

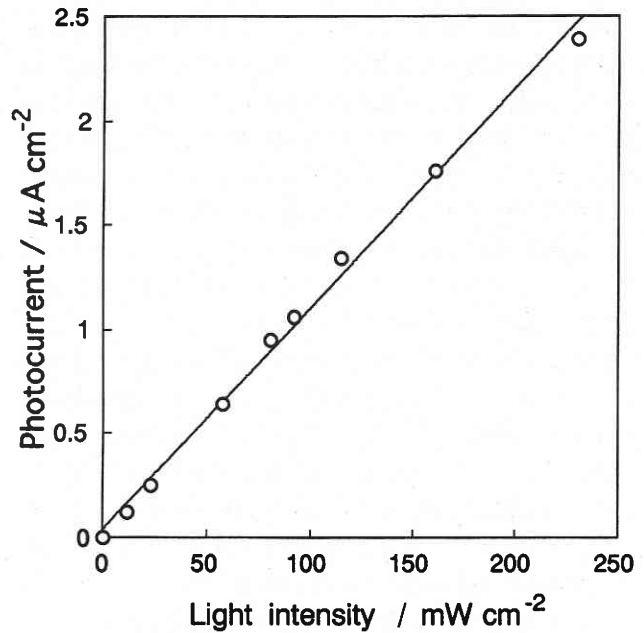


Fig. 11 Light intensity dependence of photocurrent. Electrode potential, -0.2 V vs. Ag/AgCl. ND filters were used to change light intensity.

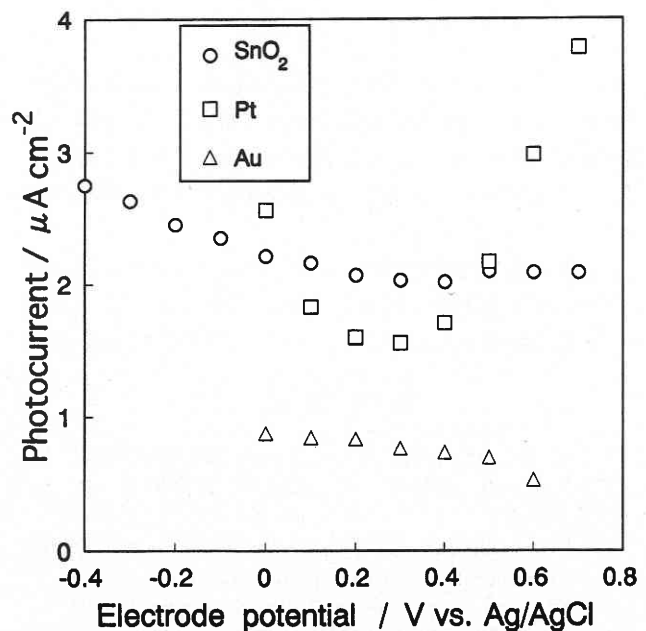


Fig. 12 Dependence of photocurrent on the electrode potential on different substrates. Green light intensity, 230 mW/cm<sup>2</sup>

から見積もった量子収率は $1.5 \times 10^{-4}$ であった。

光電流の作用スペクトル (Fig. 10) が bR の吸収スペクトルと一致することより、光電流が bR 由来だとわかる。また、入射光の強度と光電流のピーク値はよい比例関係にある (Fig. 11)。

酸化スズ電極は表面に OH 基を持ち、プロトンの解離平衡のため pH センサーに似た動作をする<sup>66)</sup>。観測される光電流は、bR が出したプロトンによる電極近傍の pH 変化を捉えたものだと仮説<sup>67)</sup>が最近出された。電極に金や白金を用い、電位を厳密に制御すれば、電極表面に OH 基が存在しない状態、すなわち pH 変化に反応しないはずの系を作れる。そこで、この仮説の検証も含めて光電流の発生機構を検討するため、金電極や白金電極に bR を固定して光電流測定を行った。電極として、金、白金をそれぞれ蒸着したガラスを電極として用い、bR の固定化と光電流測定は酸化スズ電極のときと同様に行った。

金電極や白金電極を用いた場合、酸化スズ電極上と同様に一過性のカソード光電流が観測された。各電極における光電流の電位依存性を Fig. 12 に示す。金や白金上に酸化皮膜ができていない電位域でも光電流が見られる。少なくともこの光電流は電極近傍の pH 変化に無関係だと考えられる。今後、さらに電極界面の詳しい解析を行うことにより、光電流の発生機構を明らかにする。

上記の実験では bR をキャスト法で固定化しており、分子の配向はランダムだと考えられる。配向をそろえれば光電流発生機構の解析が容易になり、光電変換デバイスの高感度化が図れるだろう。

## 5. ま と め

bR についての基礎事項と光電応答に関する従来の研究を概観し、筆者らの研究成果を簡単に紹介した。電極-溶液界面で bR が生む光電流は通常的光電変換素子とは違うユニークなパターンを持ち、新規な光デバイスの構築につながる。

光電流の発生機構を明らかにできれば、プロトンポンプのメカニズム解析の一助となるほか、bR を用いる光デバイスの設計指針も得られよう。(1996年12月27日受理)

## 参 考 文 献

- 1) S.J. Updike and G.P. Hicks, *Nature*, **214**, 986 (1967)
- 2) 鈴木一路, 吉田章一郎, 渡辺正, *生産研究*, **48**, 158 (1996)
- 3) J.H. MacAlear and J.M. Wehrung: "Towards Three Dimensional Biomolecular Logic" (1981)
- 4) F.L. Carter Ed: "Molecular Electronic Devices" (1982)
- 5) 長谷川政美, *蛋白質核酸酵素*, **38**, 1546 (1993)
- 6) 山岸明彦, *蛋白質核酸酵素*, **38**, 1556 (1993)
- 7) C.R. Woese, O. Kandler and M.L. Wheelis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 4576 (1990)
- 8) W. Stoeckenius and R. Rowen, *J. Cell Biol.*, **34**, 365 (1967)
- 9) J. Bridgen and I. D. Walker, *Biochemistry*, **15**, 792 (1976)
- 10) G.E. Gerber, C.P. Gray, D. Wildenauer and H.G. Khorana, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5426 (1977)
- 11) A.E. Blaurock and W. Stoeckenius, *Nature New Biol.*, **233**, 152 (1971)
- 12) D. Oesterhelt and W. Stoeckenius, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 2853 (1973)
- 13) E. Racker and W. Stoeckenius, *J. Biol. Chem.*, **249**, 662 (1974)
- 14) B. Schobert and J.K. Lanyi, *J. Biol. Chem.*, **257**, 10306 (1982)
- 15) M. Tsuda, N. Hazemoto, M. Kondow, N. Kamo, Y. Kobatake and Y. Terayama, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **108**, 970 (1982)
- 16) R.A. Bogomolni and J. L. Spudich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 6250 (1982)
- 17) T. Takahashi, Y. Mochizuki, N. Kamo and Y. Kobatake, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **127**, 99 (1985)
- 18) 津田基之, 前田章夫編: "視覚の分子メカニズム (蛋白質核酸酵素臨時増刊)" (1989)
- 19) R. Henderson and P. N. T. Unwin, *Nature*, **257**, 28 (1975)
- 20) R. Henderson, J.M. Baldwin, T.A. Ceska, F. Zemlin, E. Beckmann and K. H. Downing, *J. Mol. Biol.*, **213**, 899 (1990)
- 21) N. Grigorieff, T. A. Ceska, K. H. Downing, J. M. Baldwin and R. Henderson, *J. Mol. Biol.*, **259**, 393 (1996)
- 22) M. L. Applebury, K. S. Peters and P. M. Rentzepis, *Biophys. J.*, **23**, 375 (1978)
- 23) J. -M. Fang, J. D. Carriker, V. Balogh-Nair and K. Nakanishi, *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 5162 (1983)
- 24) H. -J. Polland, M. A. Frantz, W. Zinth, W. Kaiser, E. Kolling and D. Oesterhelt, *Biochim. Biophys. Acta*, **767**, 635 (1984)
- 25) H. -J. Polland, M. A. Frantz, W. Zinth, W. Kaiser, E. Kolling and D. Oesterhelt, *Biophys. J.*, **49**, 651 (1986)
- 26) R. H. Lozier, R. A. Bogomolni and W. Stoeckenius, *Biophys. J.*, **15**, 955 (1975)
- 27) T. Iwasa, F. Tokunaga and T. Yoshizawa, *Biophys. Struct. Mech.*, **6**, 253 (1980)
- 28) Y. Shichita, S. Matuoka, Y. Hidaka and T. Yoshizawa, *Biochim. Biophys. Acta*, **723**, 240 (1983)
- 29) D. Oesterhelt and B. Hess, *Eur. J. Biochem.*, **37**, 316 (1973)
- 30) S. O. Smith, J. A. Pardo, P. P. J. Mulder, B. Curry, J. Lugtenburg and R. Mathies, *Biochemistry*, **22**, 6141 (1983)
- 31) T. Kouyama, A. Kouyama, A. Ikegami, M. K. Mathew and W. Stoeckenius, *Biochemistry*, **27**, 5855 (1988)
- 32) S. P. A. Fodor, J. B. Ames, R. Gebhard, E. M. M. van den Berg, W. Stoeckenius, J. Lugtenburg and R. A. Mathies, *Biochemistry*, **27**, 7097 (1988)
- 33) H. G. Khorana, *J. Biol. Chem.*, **263**, 7439 (1988)
- 34) K. Gerwert, B. Hess, J. Soppa and D. Oesterhelt, *Proc.*

- Natl. Acad. Sci. USA, **86**, 4943 (1989)
- 35) H. J. Butt, K. Fendler, E. Bamberg, J. Tittor and D. Oesterhelt, *EMBO J.*, **8**, 1657 (1989)
- 36) H. Otto, T. Marti, M. Holz, T. Mogi, L. J. Stern, F. Engel, H. G. Khorana and M. P. Heyn, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 1018 (1990)
- 37) M. S. Braiman, T. Mogi, T. Marti, L. J. Stern, H. G. Khorana and K. J. Rothschild, *Biochemistry*, **27**, 8516 (1988)
- 38) T. Marinetti, S. Subramaniam, T. Mogi, T. Marti and H. G. Khorana, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 529 (1989)
- 39) M. Holz, L. A. Drachev, T. Mogi, H. Otto, A. D. Kaulen, M. P. Heyn, V. P. Skulachev and H. G. Khorana, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 2167 (1989)
- 40) J. Tittor, C. Soell, D. Oesterhelt, H. -J. Butt and E. Bamberg, *EMBO J.*, **8**, 3477 (1989)
- 41) L. S. Brown, J. Sasaki, H. Kandori, A. Maeda, R. Needleman and J. K. Lanyi, *J. Biol. Chem.*, **270**, 27122 (1995)
- 42) H. Kandori, Y. Yamazaki, J. Sasaki, R. Needleman, J. K. Lanyi and A. Maeda, *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 2118 (1995)
- 43) Y. Yamazaki, M. Hatanaka, H. Kandori, J. Sasaki, W. F. Jan Karstens, J. Raap, J. Lugtenburg, M. Bizounok, J. Herzfeld, R. Needleman, J. K. Lanyi and A. Maeda, *Biochemistry*, **34**, 7088 (1995)
- 44) Y. Shen, C. R. Sařnya, K. S. Liang, A. F. Ruppert and K. J. Rothschild, *Nature*, **366**, 48 (1993)
- 45) H. -W. Trissl, *Photochem. Photobiol.*, **51**, 793 (1990)
- 46) E. Bamberg, N.A. Dencher, A. Fahr and M.P. Heyn, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 7502 (1981)
- 47) D. Braun, N.A. Dencher, A. Fahr, M. Lindau and M. P. Heyn, *Biophys. J.*, **53**, 617 (1988)
- 48) S. -B. Hwang, J. I. Korenbrot and W. Stoeckenius, *J. Membr. Biol.*, **36**, 137 (1977)
- 49) J. Schildkraut and A. Lewis, *Thin Solid Films*, **134**, 13 (1985)
- 50) T. Furuno, K. Takimoto, T. Kouyama, A. Ikegami and H. Sasabe, *Thin Solid Films*, **160**, 145 (1988)
- 51) T. Miyasaka, Y. Maekawa and K. Koyama, *Thin Solid Films*, **180**, 73 (1989)
- 52) T. Miyasaka and K. Koyama, *Chem. Lett.*, 1645 (1991)
- 53) K. Nagy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **85**, 383 (1978)
- 54) G. Varo and L. Keszthelyi, *Biophys. J.*, **43**, 47 (1983)
- 55) G. I. Groma, G. Szabo and G. Varo, *Nature*, **308**, 557 (1984)
- 56) A. A. Kononenko, E. P. Lukashev, A. V. Maximychev, S. K. Chamorovsky, A. B. Rubin, S. F. Timashev and L. N. Chekulaeva, *Biochim. Biophys. Acta*, **850**, 152 (1986)
- 57) K. A. Fisher, *Methods Enzymol.*, **88**, 230 (1982)
- 58) S. Y. Liu and T. G. Ebrey, *Biophys. J.*, **54**, 321 (1988)
- 59) K. Tanaka, M. Hikuma, L. Soo-Mi, Y. Iwasaki, E. Tamiya and I. Karube, *J. Biotech.*, **10**, 127 (1989)
- 60) T. Miyasaka, K. Koyama and I. Itoh, *Science*, **255**, 342 (1992)
- 61) T. Miyasaka and K. Koyama, *Appl. Opt.*, **32**, 6371 (1993)
- 62) 宮坂力, 小山行一, *応用物理*, **61**, 1053 (1992)
- 63) N. Yamaguchi, Y. Jinbo, M. Arai and K. Koyama, *FEBS Lett.*, **324**, 287 (1993)
- 64) K. Koyama, N. Yamaguchi and T. Miyasaka, *Science*, **265**, 762 (1994)
- 65) D. Oesterhelt and W. Stoeckenius, *Methods Enzymol.*, **31**, 667 (1974)
- 66) H. A. Laitinen and T. M. Hesu, *Anal. Chem.*, **51**, 1550 (1979)
- 67) B. Robertson and E. P. Lukashev, *Biophys. J.*, **68**, 1507 (1995)